

Sobrevivência de populações de *Aedes albopictus*: idade fisiológica e história reprodutiva

Survival of *Aedes albopictus* in Brazil: physiological age and reproductive history

Zoraida Fernández^{a,*} e Oswaldo Paulo Forattini^b

^aInstituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Caracas, Venezuela. ^bDepartamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil

Descritores

Aedes. Sobrevivência. Larva. Ovário. Alimentação. Desenvolvimento ovariano. Efeito da alimentação. *Aedes albopictus*.

Resumo

Objetivos

Estudar a sobrevivência de populações de *Aedes albopictus* de ambientes rural e urbano, em diferentes condições de alimentação, e analisar sua idade fisiológica e a história reprodutiva.

Métodos

Foram coletadas larvas de *Ae. albopictus* no Vale do Paraíba (localidade urbana), e no Vale do Ribeira (localidade rural), Estado de São Paulo. As fêmeas que emergiram foram alimentadas com açúcar ou com sangue e observadas diariamente anotando a data da morte de cada uma e outras variáveis relacionadas com a reprodução. Os ovários foram dissecados seguindo a técnica de Polovodova, e a avaliação do desenvolvimento folicular segundo Christophers e Mer. Foram construídas tábuas de vida e analisadas estatisticamente as taxas de sobrevivência. Para análise dos dados foi utilizado o Stata 7.0.

Resultados

Foi observada discordância gonotrófica nas duas populações de *Ae. albopictus*. As fêmeas oníparas desenvolveram sacos terminais. As nulíparas apresentaram ovários normais e em alguns casos foram observadas dilatações. As fêmeas alimentadas com açúcar apresentaram maiores taxas de sobrevivência. Não foi detectada diferença estatística na taxa de sobrevivência entre as duas populações avaliadas.

Conclusões

A idade fisiológica e o estado de paridade de *Ae. albopictus* não foram definidas pela análise dos ovários porque estes apresentaram sacos terminais em vez de dilatações. O tipo de alimento ingerido influenciou na sobrevivência das fêmeas de *Ae. albopictus*.

Abstract

Objectives

To study the longevity of *Ae. albopictus* populations in rural and urban areas in two different feeding conditions and to assess their physiological age and reproductive history.

Methods

Ae. albopictus larvae were collected in the Paraíba Valley, (urban area) and Ribeira Valley (rural area), São Paulo State, Brazil. In the laboratory, females were fed with sugar or blood and monitored daily. The day of death of each mosquito and other

Keywords

Aedes. Survival. Larva. Ovary. Feed. Ovarian development. Effect of feeding. *Aedes albopictus*.

Correspondência para/ Correspondence to:
Zoraida Fernández
Av. Carlos Soublette, Res. Oásis, Apto 23, San Bernardino
Caracas, Venezuela
E-mail: zoferman@hotmail.com

Pesquisa financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp - Processos n. 99/10517-1 e 99/07578-9).
Trabalho realizado no Núcleo de Pesquisa Taxonômica e Sistemática em Entomologia Médica (NUPTM/FSP/USP).
*Aluna de pós-graduação, nível doutorado, da Faculdade de Saúde Pública da USP.
Recebido em 3/6/2002. Reapresentado em 16/12/2002. Aprovado em 15/1/2003.

reproduction related characteristics were registered. Ovaries were dissected using Polovodova techniques and follicular development was examined according Christophers and Mer. Life tables were created and statistics analysis was performed for survival rates. Data analysis was carried out using Stata 7.0.

Results

Gonotrophic discordance was seen in both populations. Parous females developed terminal sacs. Nulliparous females had normal ovaries and in some cases dilatations were seen. Females fed with sugar showed higher survival rates. Statistical difference in survival rates was not observed in the populations of both areas.

Conclusions

*Parity status and physiological age of *Ae. albopictus* were not described using ovarioles analysis because they formed terminal sacs instead of dilations. Longevity of *Ae. albopictus* females was influenced by the food provided.*

INTRODUÇÃO

Aedes (Stegomyia) albopictus (Skuse) é espécie de origem asiática que foi assinalada pela primeira vez no Brasil, no Estado do Rio de Janeiro, por Forattini⁶ (1986). Posteriormente, dispersou-se para outros Estados, ocorrendo atualmente em 17 deles.^{1,5}

Essa espécie tem grande importância epidemiológica pela sua capacidade de colonizar ambientes rurais e urbanos. Além disso, há de se considerar seu potencial vetorial para diferentes agentes patogênicos que podem afetar a população humana e canídea, a exemplo dos vírus da dengue e dirofilariose, respectivamente.

Estudos sobre a biologia de *Ae. albopictus*, compilados por Hawley¹¹ (1988), têm sido realizados principalmente com populações da Ásia e dos Estados Unidos. A sobrevivência das fêmeas é um parâmetro entomológico importante, porque constitui fator imprescindível na avaliação da capacidade vetora. Quanto maior a sobrevivência das fêmeas, maior a probabilidade dessas se infectarem por agentes patogênicos, aos quais essa espécie é suscetível, e transmiti-los. A maioria dos estudos que avaliaram a sobrevivência de *Ae. albopictus* foi feita em condições de laboratório (Hylton 1977 e 1969, Gao et al 1984 apud Estrada-Franco & Craig,⁵ 1995), excetuando o estudo realizado com duas populações da América do Norte de marcação e recaptura (NOMCB 1987, apud Estrada-Franco & Craig⁵).

Em condições de laboratório tem sido observado que a sobrevivência das fêmeas de *Ae. albopictus* é afetada pela temperatura, pela umidade relativa e pelo alimento ingerido.^{5,10} Gubler & Bhattacharya¹⁰ (1971) observaram que a 26°C, umidade relativa de 50 a 60% e repasto sanguíneo constante, as fêmeas sobreviviam de 38 a 112 dias. Enquanto que, Hien¹² (1976) observou que fêmeas mantidas nas mesmas condi-

ções de temperatura e umidade e alimentadas com água tinham uma sobrevida de cinco a sete dias.

Os estudos mencionados estimaram e expressaram a idade cronológica do mosquito, isto é, em dias de vida. Por outro lado, a paridade e o número de ciclos ovarianos, pelos quais a fêmea passa após exercer hematofagia, representam a chamada idade fisiológica. Esta pode ser feita pela observação das dilatações formadas nos ovários após a oviposição. As técnicas desenvolvidas por Polovodova (apud Nayar & Pierce¹⁵) e Detinova⁴ (1962) permitem diferenciar fêmeas nulíparas de fêmeas oníparas. Segundo essas técnicas, após cada oviposição, forma-se no pedicelo folicular estrutura semelhante a saco que posteriormente se contrai em dilatação e persiste no tempo. Tanto a oogênese normal como a abortiva, formam dilatações. Desta forma, o número de dilatações corresponde com a idade gonotrófica.

Devido ao baixo grau de paridade e certas aberrações encontradas em algumas espécies de mosquito Lange (apud Hoc & Charlwood¹³) apresentaram novas interpretações dos conceitos anteriores, surgindo assim a chamada “Escola Nova” (Frost & Brust,⁹ 1994). Lange (apud Hoc & Charlwood¹³) propuseram que os sacos foliculares não se contraem, não sendo possível correlacionar o número de ciclos gonotróficos com o grau de paridade. As dilatações encontradas são produto de oogênese abortiva. Quando uma oogênese normal ocorre após uma abortiva, a dilatação formada anteriormente é eliminada.¹²

Em alguns casos, quando as fêmeas são alimentadas com açúcar por longo período, podem formar-se dilatações falsas ou agonotróficas.¹² As dilatações agonotróficas podem ser diferenciadas das gonotróficas por manter a estrutura celular do pedicelo.

Estudos sobre a idade fisiológica em *Ae. albopictus* têm sido realizados em condições de laboratório (Liu,

1965 e Chan, 1971; apud Gubler & Bhattacharya¹⁰), mostrando que há subestimação da idade da fêmea baseando-se na análise dos ovários porque o número de dilatações não corresponde ao número de ciclos gonotróficos completados.

Estudos feitos com *Ae. albopictus* assinalam que esta espécie não apresenta concordância gonotrófica, precisando de dois ou mais repastos sangüíneos para completar o desenvolvimento dos ovos.^{9,10} Esta observação é importante do ponto de vista epidemiológico, considerando que a fêmea pode procurar mais de um hospedeiro para completar o ciclo gonotrófico.

Os objetivos do presente trabalho foram estudar, em condições de laboratório, a sobrevivência das fêmeas de *Ae. albopictus* coletadas em ambientes rural e urbano, no Estado de São Paulo, sob duas condições de alimentação, e analisar a idade fisiológica e a história reprodutiva de ambas as populações.

MÉTODOS

Áreas de estudo

Larvas de *Ae. albopictus* do terceiro e quarto estágio foram coletadas em recipientes artificiais utilizando conchas, em localidades urbana e rural do Estado de São Paulo. A localidade urbana corresponde à cidade Pindamonhangaba, situada no Vale do Paraíba, ao Sudeste do Estado (22°55'50"S e 45°27'22"O). Apresenta altitude entre 551 a 580 metros, temperatura média anual de 17°C a 20°C, e precipitação média anual de 1.000 mm. A população é de 108.500 habitantes e as principais atividades econômicas são a agricultura, indústria e pecuária.*

A localidade rural é a vila das Pedrinhas, pertencente ao município de Ilha Comprida, no Vale do Ribeira, litoral Sul do Estado (23°91'S e 47°80'O). Esta Ilha está a poucos metros acima do nível do mar, tem extensão de 70 Km de comprimento e aproximadamente 3 Km de largura. A temperatura média anual é de 24°C e a precipitação oscila entre 36 mm e 600 mm. É um pequeno núcleo com cerca de 400 habitantes e 231 edificações, das quais 35% são habitadas permanentemente, o restante sendo habitações de veraneio. Em sua maior parte, a Ilha é constituída por comunidades de caiçaras que mantêm suas culturas e sobrevivem de atividades artesanais.⁷

Colônias de mosquitos

As larvas de *Ae. albopictus* coletadas nas duas localidades foram transportadas ao laboratório, onde

foram colocadas em bacias de metal com água destilada, cloreto de sódio e alimento (Tetramin®) para peixe. Os adultos que emergiram foram mantidos na estufa à temperatura de 26°C a 28°C e umidade relativa (UR) de 70% a 80%.

Experimentos de sobrevivência

Após quatro dias de emergência, 50 fêmeas de cada localidade foram separadas individualmente em frascos de borrel previamente preparados com algodão umedecido. Essas fêmeas foram alimentadas com sangue humano e mantidas na estufa sob condições de temperatura e UR controladas. O repasto sangüíneo foi repetido após a postura de ovos. Cada exemplar foi observado diariamente, sendo anotados números de repastos, de oviposições, de ovos por oviposição e a data de morte de cada um. Após a morte, cada fêmea foi dissecada para determinar a condição de paridade, de acordo com a técnica proposta por Polovodova (apud Service¹⁶) e o desenvolvimento folicular, segundo Christophers e Mer (apud Charlwood et al.² 1980).

Simultaneamente, foram selecionadas 50 fêmeas de cada localidade, colocadas em gaiolas e mantidas na estufa em condições de temperatura e UR controladas. Essas fêmeas foram alimentadas com solução açucarada (10%) e observadas diariamente, anotando-se a data de morte de cada uma. Posteriormente, cada fêmea foi dissecada para analisar os ovários e o desenvolvimento folicular.

Análises estatísticas

Foram construídas tábuas de vida e curvas de sobrevivência para os mosquitos de cada localidade e a condição de alimento.

Foram definidas as classes de idade, sendo a classe 1 = 0 a 5 dias, classe 2 = 5 a 10 dias, e assim sucessivamente.

A esperança de vida ao nascer para cada caso foi calculada da seguinte forma:¹⁴

$$e_0 = \frac{Tx}{nx}$$

$$\text{onde, } Tx = \sum_{x=x}^{x=w} Lx \quad \text{e} \quad Lx = \frac{l_x + l_{(x+1)}}{2}$$

onde l_x é a proporção de mosquitos vivos no início da classe de idade x e, $l_{(x+1)}$ a proporção de mosquitos vivos ao início da seguinte classe de idade $x+1$; T_x é uma função acumulativa que representa o total de sobreviventes entre a idade x e a última idade w , e nx é o número total de mosquitos ao início do experimento.

*Dados disponíveis no site: <http://www.pindamonhangaba.com.br>

A variância do valor estimado $\hat{e}o$ foi calculada da seguinte forma:

$$\text{var}(\hat{e}o) = \sum_{x=0}^{m-1} \left[\frac{S_x^2 + 1qx}{px(nx - 0.5ax)} \right], \text{ sendo,}$$

$$Sx = lx + lx + 1 + \dots + lm - 1 + 0.5lm$$

onde qx é a taxa finita de mortalidade no intervalo de idade x a $x+1$; px é a taxa finita de sobrevivência no intervalo de idade x a $x+1$; ax é o número de mortes acidentais ou perdas de mosquitos no intervalo x a $x+1$; Sx é a taxa de sobrevivência e m é o número de classes de idade. A partir desta variância foram obtidos os intervalos de confiança com 95% de significância da forma usual:

$$IC = \hat{e}o \pm t\alpha(DP)$$

onde $t\alpha$ é o valor de t-Student para (n-1) graus de liberdade e DP é o desvio-padrão estimado como,

$$DP = \sqrt{\text{var}(\hat{e}o)}$$

Simultaneamente foi utilizado o teste estatístico log-rank disponível no programa estatístico Stata 7.0,¹⁷ para avaliar a significância das diferenças das taxas de sobrevivências obtidas.

RESULTADOS

Na Tabela 1, observa-se que 62% das fêmeas do Vale do Paraíba e 50% do Vale do Ribeira desenvolveram saco terminal. Em 32% do Vale do Paraíba e 38% do Vale do Ribeira não foi possível observar nenhuma modificação nos ovários. Do total de fêmeas analisadas, 6% do Vale do Paraíba e 12% do Vale do Ribeira apresentaram dilatações evidentes.

Nos Vales do Paraíba e do Ribeira, 78% e 84% das fêmeas, respectivamente, apresentaram folículos nas fases III-V, indicando o desenvolvimento de ovos como produto da constante atividade hematófaga. Nas fêmeas que receberam um repasto sanguíneo, 18%

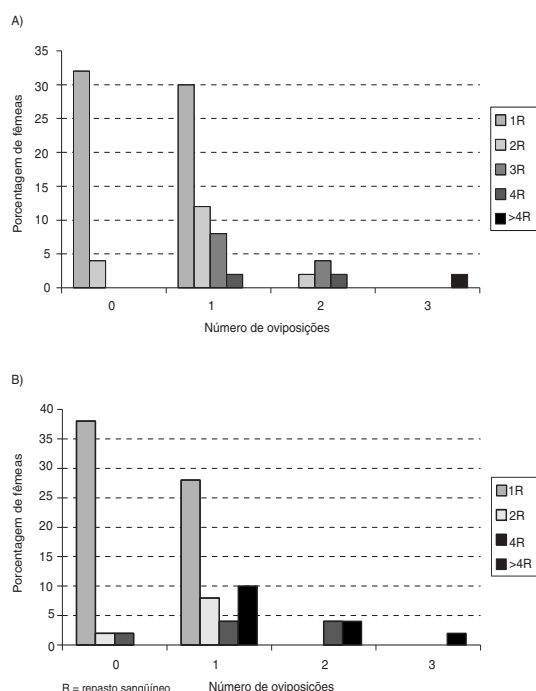


Figura 1 - Distribuição das fêmeas de *Ae. albopictus* do Vale do Paraíba (A) e Vale do Ribeira (B) em relação ao número de repastos sanguíneos e número de oviposições.

do Vale do Paraíba e 8% do Vale do Ribeira apresentaram folículos nas fases I-II.

Nas fêmeas das duas localidades houve discordância gonotrófica. Assim, 32% das fêmeas do Vale do Paraíba e 38% do Vale do Ribeira fizeram dois ou mais repastos sanguíneos para ovipor. Da mesma forma, houveram fêmeas que após o primeiro repasto realizaram uma oviposição, 30% do Vale do Paraíba e 28% do Vale do Ribeira (Figura 1).

Das fêmeas alimentadas com solução açucarada, 90% do Vale do Paraíba e 94% do Vale do Ribeira apresentaram ovários com desenvolvimento normal, enquanto 8% e 4%, respectivamente, desenvolveram ovários reduzidos (Tabela 2). Foram observadas dilatações em 2% das fêmeas das duas populações. Os folículos de 50% das fêmeas do Vale do Paraíba e 56% do Vale do Ribeira estavam nas fases I-II. No

Tabela 1 - Desenvolvimento folicular, segundo Chistophers e Mer, das fêmeas de *Ae. albopictus* do Vale do Paraíba e do Vale do Ribeira, alimentadas com sangue.

Estádio dos ovários	Fase I-II		Fase III-IV		Fase V		Indeterminado	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Vale do Paraíba								
Dilatação					2	4	1	2
Saco terminal	8	16	4	8	19	38		
Sem dilatação nem saco	1	2	2	4	12	24	1	2
Vale do Ribeira								
Dilatação	1	2			5	10		
Saco terminal	1	2	7	14	16	32	1	2
Sem dilatação nem saco	2	4	3	6	11	22	3	6

Tabela 2 - Desenvolvimento folicular, segundo Chistophers e Mer, das fêmeas de *Ae. albopictus* do Vale do Paraíba e do Vale do Ribeira, alimentadas com açúcar.

Estádio dos ovários	Fase I-II		Fase II-III		Fase III-IV		Indeterminado	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Vale do Paraíba								
Normal	22	44	13	26	6	12	4	8
Dilatação			1	2				
Ovário reduzido	3	6			1	2		
Vale do Ribeira								
Normal	26	52	9	18	6	12	6	12
Dilatação			1	2				
Ovário reduzido	2	4						

entanto, 42% das fêmeas da localidade urbana e 42% da rural apresentaram folículos nas fases II-IV.

Em média, as fêmeas do Vale do Paraíba ovipuseram 40,53 \pm 24,83 ovos após um primeiro repasto sangüíneo, em comparação com 31,33 \pm 20,61 ovos colocados pelas fêmeas do Vale do Ribeira. Esta diferença não foi significativa (t-student=1,28; P>0,05).

Na Tabela 3 observa-se que as fêmeas das duas localidades apresentaram esperanças de vida ao nascer (êo) significativamente maiores, quando alimentadas com açúcar [Chi²=39,75 (P>chi²=0,00)]. No entanto, a análise estatística Log-rank não revelou diferenças significativas entre as fêmeas das duas localidades [Chi²=3,40 (P>chi²=0,0653)].

As curvas da taxa de sobrevivência das fêmeas das duas localidades, para cada tipo de alimento, mostraram comportamento similar (Figura 2).

Ao analisar a Tabela 4 observa-se que não houve sobreposição entre os intervalos de confiança das fêmeas do Vale do Paraíba, alimentadas com sangue e com açúcar, mas sim, entre os intervalos de confiança

das fêmeas do Vale do Ribeira. Portanto, as diferenças na sobrevivência no primeiro caso são significativas, mas não no segundo caso.

DISCUSSÃO

A discordância gonotrófica observada em *Ae. albopictus* das duas localidades é característica que foi descrita anteriormente por outros pesquisadores com populações de outras localidades.^{9,10} Este comportamento é importante porque incrementa a probabilidade da fêmea se infectar e transmitir agentes infecciosos de um hospedeiro para outro.

As fêmeas das duas localidades mostraram comportamento similar em relação ao número de ovos por oviposição. Segundo Hien¹¹ (1976), a quantidade de ovos postos por fêmea depende da idade fisiológica do mosquito, do peso corporal após emergência e, principalmente, do volume de sangue ingerido.

O número de ovos colocados por fêmea foi baixo, se comparado ao relatado em outro trabalho feito em condições de laboratório,¹¹ provavelmente devido à ausência de açúcar na alimentação, nas fêmeas alimentadas com sangue. Segundo Foster⁸ (1995), a presença de sangue e de açúcar incrementa a fecundidade das fêmeas, porém Day et al³ (1994) não encontraram diferenças significativas ao comparar esta característica em fêmeas de *Aedes aegypti* mantidas em diferentes condições de alimentação.

Hawley¹⁰ (1988) assinalou que nas *Ae. Albopictus* forma-se dilatação evidente nos ovários após oviposição. No presente trabalho, as dilatações foram observadas em pequena percentagem das fêmeas examinadas. A maioria delas apresentou sacos terminais bem definidos. Assim mesmo, foram encontra-

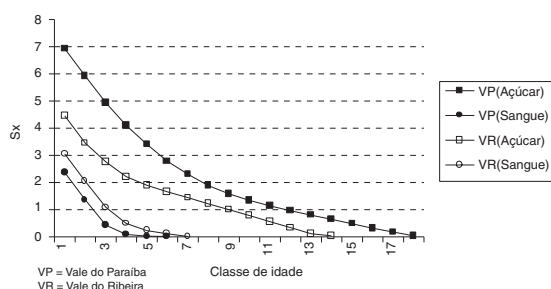


Figura 2 - Taxas de sobrevivência das fêmeas de *Ae. albopictus* das duas localidades de acordo com o tipo de alimento.

Tabela 3 - Esperança de vida ao nascer, segundo o tipo de alimentação, das fêmeas de *Ae. albopictus* de cada localidade.

Localidade	Esperança de vida ao nascer (dias) \pm DP Açúcar	Esperança de vida ao nascer (dias) \pm DP Sangue
Vale do Paraíba	32,3 \pm 3,43	9,4 \pm 0,55
Vale do Ribeira	20 \pm 3,07	12,8 \pm 0,93

DP: Desvio-padrão.

Tabela 4 - Intervalos de confiança das esperanças de vida ao nascer das fêmeas de *Ae. albopictus* de cada localidade.

Localidade	Intervalos de confiança (Dias)* Açúcar	Intervalos de confiança (Dias)* Sangue
Vale do Paraíba	25,59-39,01	8,32-10,48
Vale do Ribeira	13,98-26,02	10,98-16,37

*95% de significância.

das dilatações em 2% das fêmeas, das duas localidades, alimentadas com solução açucarada. Estas observações concordam com os conceitos propostos pela “Escola Nova”,¹³ que considera os sacos terminais consequência de oogêneses normais e as dilatações como resultado de oogêneses abortivas.

Trabalhos compilados por Hawley¹¹ (1988) mencionam que populações de *Ae. Albopictus* criadas em condições de laboratório podem apresentar autogenia. No presente trabalho, não foram achados ovos maduros nas fêmeas alimentadas com solução açucarada, porém, 38% das fêmeas do Vale do Paraíba e 30% do Vale do Ribeira apresentaram folículos nas fases II-IV, indicando possível formação de ovos.

As fêmeas alimentadas com solução açucarada mostraram maior esperança de vida ao nascer, comparadas às fêmeas alimentadas com sangue. Resultados similares, com populações de outras localidades, foram reportados em outros trabalhos.^{14,18} O sangue humano pode prover glicose para as fêmeas sobreviverem, mas não fornece os aminoácidos necessários para a sua subsistência. Foster⁸ (1995) assinala que a importância do açúcar na vida do mosquito parece ter evoluído distintamente em diferentes espécies: pode ser essencial e ubíquo ou facultativo e incidental.

Nas espécies anautógenas o açúcar é essencial e, em algumas espécies autógenas, pode ser necessário para completar a reprodução ou pode ter desenvolvido independência dele, como parece ocorrer com *Ae. Aegypti*.³ As reservas energéticas dos mosquitos, como glicogênio e lipídios, provêm da fase larvária, mas são reabastecidas pelo açúcar e sangue ingerido na fase adulta. Essas substâncias participam na cópula, repasto sanguíneo, desenvolvimento dos ovos e oviposição nas espécies anautógenas.

Os resultados parecem mostrar que *Ae. Albopictus* é uma espécie naturalmente anautógena, embora possa apresentar comportamento autógeno em condições de laboratório.

AGRADECIMENTOS

À Professora Iná Kakitani e ao Prof. José Maria Soares Barata, do Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da USP, respectivamente, pela valiosa colaboração no treinamento nas técnicas de dissecação dos mosquitos e pelo acesso ao programa estatístico Stata; à Superintendência de Controle de Endemias (Sucen) de Taubaté e aos funcionários da Faculdade de Saúde Pública de São Paulo e Pariqueira-Açu, pela colaboração na coleta e manipulação dos mosquitos.

REFERÊNCIAS

1. Borges SM dos AA. Importância epidemiológica do *Aedes albopictus* nas Américas [Dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2001.
2. Charlwood JD, Rafael JA, Wilkes TJ. Métodos de determinar a idade fisiológica em Díptera de importância médica. Uma revisão com especial referência aos vetores de doenças na América do Sul. *Acta Amazonica* 1980;10:311-33.
3. Day JF, Edman JD, Scott TW. Reproductive fitness and survivorship of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) maintained on blood, with field observations from Thailand. *J Med Entomol* 1994;31:611-7.
4. Detinova TS. *Age grouping methods in Diptera of medical importance*. Geneva: WHO; 1962. (Monograph series, 47).
5. Estrada-Franco JG, Craig GB. *Biology, disease relationships, and control of Aedes albopictus*. Washington (DC): Pan-American Health Organization; 1995. (Technical paper, 42).
6. Forattini OP. Identificação de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) no Brasil. *Rev Saúde Pública* 1986;20:244-5.
7. Forattini OP, Kakitani I, dos Santos R, Kobayashi KM, Ueno HM, Fernández Z. Comportamento de *Aedes albopictus* e de *Ae. scapularis* adultos (Díptera: Culicidae) no Sudeste do Brasil. *Rev Saúde Pública* 2000;34:461-7.
8. Foster WA. Mosquito sugar feeding and reproductive energetics. *Ann Rev Entomol* 1995;40:443-74.
9. Fox AS, Brust RA. How do dilatations form in mosquito ovarioles? *Parasitol Today* 1994;10:19-23.
10. Gubler DJ, Bhattacharya NC. Observations on the reproductive history of *Aedes (Stegomyia) albopictus* in the laboratory. *Mosq News* 1971;30:356-9.
11. Hawley WA. The biology of *Aedes albopictus*. *J Am Mosq Control Assoc* 1988;Suppl 1:1-40.

12. Hien DS. Biology of *Aedes aegypti* (L., 1762) and *Aedes albopictus* (Skuse, 1895) Diptera, Culicidae. V. The gonotrophic cycle and oviposition. *Acta Parasit Pol* 1976;24:37-55.
13. Hoc TQ, Charlwood JD. Age determination de *Aedes cantans* using the ovarian oil injection technique. *Med Vet Entomol* 1990;4:227-33.
14. Krebs CJ. *Ecological methodology*. Menlo Park: Addison Wesley Longman; 1999.
15. Nayar JK, Pierce PA. The effect of diet on survival, insemination and oviposition of *Culex nigripalpus* Theobald. *Mosq News* 1980;40:210-7.
16. Service MW. *Mosquito ecology, field sampling methods*. London: Applied Science Publishers; 1993.
17. STATA Release 7. [Computer program]. Versão 7.0. Texas: Press College Station; 2001.
18. Volozina NV. The effect of the amount of blood taken and additional carbohydrate nutrition on oogenesis in females of blood-sucking mosquitoes of the genus *Aedes* (Diptera: Culicidae) of various weights and ages. *Entomol Rev* 1967;46:27-32.